



Гаин Ю.М.✉, Бордаков П.В., Шахрай С.В., Гаин М.Ю., Владимирская Т.Э.
Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Экспериментальное обоснование применения регенеративных технологий и высокоинтенсивного лазерного излучения в лечении хронических ран промежности

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Гаин Ю.М. – концепция и дизайн исследования, анализ материалов и результатов, написание статьи; Бордаков П.В. – проведение исследования, сбор, анализ материалов и результатов, написание статьи; Шахрай С.В., Гаин М.Ю., Владимирская Т.Э. – проведение исследования, участие в анализе материалов и результатов.

Финансирование. Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований Белорусской медицинской академии последипломного образования. Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей авторы не получили.

Этическое заявление. Работа выполнялась в соответствии с этическими нормами, обсуждена на заседании комитета по этике научных исследований Белорусской медицинской академии последипломного образования (протокол № 1 от 4 января 2016 г.).

Подана: 02.11.2023

Принята: 11.12.2023

Контакты: gain@tut.by

Резюме

Цель. Изучить возможности, оценить эффективность и провести экспериментальное обоснование целесообразности использования при лечении хронических ран промежности локальной клеточной терапии и высокоинтенсивного лазерного излучения определенных параметров.

Материалы и методы. После моделирования хронической раны промежности у животных первой группы А (n=24) на область хронической раны осуществляли воздействие расфокусированным лазерным излучением длиной волны 1560 нм (0,1 с / 0,1 с, 5 Вт, диаметр светового пятна 0,7 см, дистанция 2 см, суммарная экспозиция 10 с). Во второй группе животных Б (n=24) в края и дно раны инъекционно вводили суспензию аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) (1 мл, 500 тыс/мл). В третьей группе животных В (n=24) в края и дно раны вводили 2 мл аллогенной обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы (L-PRP). В четвертой группе Г (n=24) в края раны однократно вводили 2 мл физиологического раствора поваренной соли (плацебо-контроль).

Результаты. В результате проведенного исследования установлено, что применение регенеративных технологий в лечении экспериментальной хронической раны (воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения длиной волны 1560 нм, инъекционного введения аллогенных МСК ЖТ и L-PRP) позволяет в 1,84–2,5 раза сократить медианные сроки эпителизации раневого дефекта в сравнении с группой плацебо-контроля (Mann – Whitney U Test Z=5,641231, p=0,0000001).

Выводы. Ввиду выявленного в экспериментальных исследованиях значимого регенераторного эффекта в отношении хронических ран промежности анализируемых

методов следует считать целесообразным их местное использование в клинических условиях.

Ключевые слова: хроническая рана, лазерное излучение, мезенхимальные стволовые клетки, обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма

Gain Yu.✉, Bordakov P., Shakhrai S., Gain M., Vladimirskaia T.

Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Experimental Substantiation of the Use of Regenerative Technologies and High-Intensity Laser Radiation in the Treatment of Chronic Perineal Wounds

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Gain Yu. – concept and design of the study, analysis of materials and results, writing the article; Bordakov P. – conducting research, collecting, analyzing materials and results, writing an article; Shakhrai S., Gain M., Vladimirskaia T. – conducting research, participating in the analysis of materials and results.

Funding. The work was carried out in accordance with the research plan of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education. The authors did not receive financial support from manufacturing companies.

Ethics statement. The work was carried out in accordance with ethical standards, discussed at a meeting of the Committee on Ethics of Scientific Research of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Protocol No. 1 of 01/04/2016).

Submitted: 02.11.2023

Accepted: 11.12.2023

Contacts: gain@tut.by

Abstract

Purpose. To study the possibilities, evaluate the effectiveness and conduct an experimental substantiation of the feasibility of using local cell therapy and high-intensity laser radiation of certain parameters in the treatment of chronic perineal wounds.

Materials and methods. After modelling a chronic wound of the perineum in animals of the first group A (n=24), the area of the chronic wound was exposed to defocused laser radiation with a wavelength of 1560 nm (0.1 s / 0.1 s, 5 W, light spot diameter 0.7 cm, distance 2 cm, total exposure 10 s). In the second group of animals B (n=24), a suspension of allogeneic adipose tissue mesenchymal stem cells (AT MSCs) (1 ml, 500 thousand/ml) was injected into the edges and bottom of the wound. In the third group of animals C (n=24), 2 ml of allogeneic platelet- and leukocyte-rich plasma (L-PRP) was injected into the edges and bottom of the wound. In the fourth group D (n=24), 2 ml of physiological sodium chloride solution was injected once into the edges of the wound (placebo control).

Results. As a result of the study, it was established that the use of regenerative technologies in the treatment of an experimental chronic wound (exposure to high-intensity laser radiation with a wavelength of 1560 nm, injection of allogeneic VT MSCs and L-PRP, allows to reduce the median time of wound epithelization by 1.84–2.5 times defect compared to the placebo control group (Mann – Whitney U Test $Z=5.641231$, $p=0.0000001$).

Conclusions. In view of the significant regenerative effect of the analyzed methods on chronic perineal wounds identified in experimental studies, their local use in clinical settings should be considered appropriate.



Keywords: chronic wound, laser radiation, mesenchymal stem cells, platelet- and leukocyte-rich plasma

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хронические раны являются значимой медицинской и социальной проблемой для общества, существенно снижающей качество жизни пациентов, накладывающей особый отпечаток на медицинскую деятельность и огромное финансовое бремя на экономику большинства стран мира. Только в США ежегодно медицинская помощь оказывается 6,5 млн пациентов с данной патологией с финансовыми затратами из государственного бюджета на эти цели более 25 млрд долларов [1, 2]. В экономически развитых странах затраты на лечение этой категории пациентов составляют 2–4% от общего объема государственных расходов на здравоохранение [3, 4]. Хронические раны ложатся тяжелым бременем как на пациентов, так и на членов их семей, они сопровождаются болями, инфицированием, утратой функций и значительными финансовыми затратами, нередко приводят к тяжелым операциям, ампутациям или сепсису. Только у 30–75% пациентов такие язвы заживают после 6 месяцев интенсивного лечения [5]. Сегодня эта патология рассматривается как вторичная, она занимает свое почетное место среди важнейших медико-биологических проблем человечества, таких как старение населения, ожирение и сахарный диабет. Хронические раны распространяются в людской популяции как тихая эпидемия, ежегодно влияя на качество жизни более 40 млн человек во всем мире, создавая серьезную угрозу общественному здоровью и экономике большинства цивилизованных стран мира [4, 6–8].

Сегодня в специальной литературе хроническую рану описывают как дефект тканей в состоянии регенерации с нарушением в цепи одной или нескольких фаз данного процесса [9]. Чаще всего в хронической ране процесс регенерации нарушается на этапе фазы воспаления и/или регенерации [10, 11]. К системным факторам, ведущим к развитию хронической раны, относят пожилой возраст, иммунодефицитные состояния, заболевания системы кровообращения с явлениями сердечной недостаточности, артериальную гипертензию, васкулиты, кахексию, полинейропатию, стресс, ангиопатии, ангиодисплазии, онкологические заболевания, нарушения углеводного обмена (сахарный диабет), подагру, антифосфолипидный синдром, коллагенозы и другие системные (аутоиммунные) заболевания [12–15]. Доказанными местными факторами развития хронической раны являются: нарушение притока артериальной крови, нарушение венозного оттока, повторяющаяся травма тканей, персистирующая инфекция, критическая микробная колонизация, локальное нарушение иннервации, длительный отек тканей, наличие инородных тел или несъемных протезов в зоне раны, малигнизация, непрерывное натяжение кожных краев [2, 13, 14, 16].

Особое место среди обозначенной патологии занимают хронические раны промежности и крестцово-копчиковой области, характеризующиеся особой тяжестью течения и толерантностью ко многим применяемым методам лечения. Важнейшими факторами их развития служат: постоянная механическая травматизация ран и близость к естественным выводным отверстиям организма с непрерывной

или персистирующей контаминацией поверхности патогенной микрофлорой (в том числе и анаэробной), а также химическими компонентами мочи и кала [2, 13].

Анализ литературы и результаты собственных исследований авторов позволяют говорить о том, что хронические раны являются значимой медицинской и социальной проблемой для общества, не только существенно снижающей качество жизни пациентов, но и накладывающей особый отпечаток на деятельность врачей и существенное финансовое бремя на государственные системы здравоохранения большинства стран мира. За последние годы получены новые данные, свидетельствующие об определенном прогрессе в понимании клеточных и молекулярных механизмов заживления ран в норме и при наличии ряда заболеваний, а также причин, приводящих к хронической трансформации ран, и основных факторов, способствующих этому процессу.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить возможности, оценить эффективность и провести экспериментальное обоснование целесообразности использования при лечении хронических ран промежности локальной клеточной терапии и высокоинтенсивного лазерного излучения определенных параметров.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн экспериментальных исследований разработан с целью обоснования созданных принципиально новых (с технической и методологической позиций) малоинвазивных методов лечения хронических ран промежности и крестцово-копчиковой области, которые могут применяться для лечения пациентов в хирургическом стационаре или в стационаре с краткосрочным пребыванием пациентов, а также в амбулаторных условиях. Все экспериментальные исследования проведены с использованием 145 особей белых рандомбредных крыс обоего пола в возрасте от 1 года до 2 лет ($M_e=1,53$ года, $Q_{25}-Q_{75}=1-2$) с массой тела от 210 до 286 г ($M=254,4\pm 12,6$ г) в условиях патофизиологической, патоморфологической и иммунологической групп Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО). Все экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с современными принципами и нормами биоэтики [17, 18].

Для моделирования хронической раны промежности под внутримышечным наркозом в пахово-бедренной области на расстоянии от анального отверстия 1–1,5 см подкожно инъекционно шприцем вводили микробно-каловую суспензию из расчета 0,5 мл на 200 г веса животного. Суспензию готовили за 10 минут до эксперимента из содержимого прямой кишки животного (кала) путем разведения его в соотношении 1 : 4 физиологическим (0,9%-ным) раствором поваренной соли и последующей фильтрации гомогената через 5 слоев медицинской марли. Через 3 суток в области инъекции формировался воспалительный инфильтрат $3,2\pm 1,1$ см в диаметре, к 7-м суткам отмечалось центральное размягчение инфильтрата с формированием в этой зоне подкожного гнояника со средними размерами $1,2\pm 0,2$ см. В этот срок под внутримышечным наркозом выполняли иссечение передней стенки абсцесса с переходом линии разреза на анальный канал, в результате чего формировался раневой дефект мягких тканей анально-перианальной области $1,5\pm 0,3$ см² с гнилостными краями



и дном. На 3-и, 7-е и 14-е сутки после вскрытия абсцесса производили инъекционное введение в мягкие ткани краев раневого дефекта со стороны раны инсулиновым шприцем микробно-каловой суспензии в комбинации с медицинским гелем для УЗИ средней плотности «Медигель» (вязкость по Брукфильду 23,0–27,0 Пахс [соответствует вязкости 12,0–14,0 Пахс при скорости сдвига $(16,8 \pm 0,3) \text{ с}^{-1}$]) в соотношении 1 : 1 общим объемом 0,6 мл. После моделирования патологического процесса у всех животных рана спонтанно не заживала в сроки 30 и более суток. Средние сроки полной самопроизвольной регенерации хронической раны составили $Me=39,7$ (95% ДИ 32–44). Ввиду отсутствия достоверных различий (по морфологии, цитологии, размерам) на 21-е и 30-е сутки с целью повышения эффективности эксперимента именно 21-е сутки от начала моделирования патологического процесса определены как срок формирования хронической раны у лабораторного животного и готовности раны для экспериментальной оценки эффективности новых лечебных технологий. Площадь хронической раны при этом составила $Me=4,02 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=3,19-4,85$).

Животные с моделированным патологическим процессом произвольно разделены на 4 группы. У животных первой группы А ($n=24$) на область хронической раны осуществляли воздействие расфокусированным лазерным излучением длиной волны 1560 нм ($0,1 \text{ с} / 0,1 \text{ с}$, 5 Вт, диаметр светового пятна 0,7 см, дистанция 2 см, суммарная экспозиция 10 с). Воздействие на рану лазером проводили в большинстве случаев однократно медицинским аппаратом «Медиола компакт» (ЗАО «ФОТЭК», Республика Беларусь) с использованием специальных приспособлений для доставки лазерной энергии к тканям. Во второй группе животных Б ($n=24$) в края и дно раны инъекционно вводили суспензию аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) (1 мл, 500 тыс/мл). МСК ЖТ вводили в область раны однократно. В третьей группе животных В ($n=24$) в края и дно раны вводили 2 мл аллогенной обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы (L-PRP или ОТЛП). L-PRP вводили в края раны однократно (как правило, в 4 точки по периметру раны). В четвертой группе Г ($n=24$) в края раны однократно вводили 2 мл физиологического раствора поваренной соли (плацебо-контроль).

Обогащенную тромбоцитами и лейкоцитами аллогенную плазму (ОТЛП или L-PRP) получали из крови крыс-доноров, смешанной с раствором цитрата натрия (3,8%) в соотношении «кровь/цитрат = 9/1». Образцы крови осторожно встряхивали для тщательного смешивания с антикоагулянтом. На первом этапе получения ОТЛП и тромбоциты отделяли от эритроцитов и лейкоцитов путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. при комнатной температуре. Полученный супернатант отбирали и повторно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. при 4°C . Верхние 2/3 обедненной тромбоцитами плазмы удаляли из пробирки. Оставшийся осадок, содержащий тромбоциты и незначительную примесь эритроцитов и лейкоцитов, разводили в 1 мл обедненной тромбоцитами плазмы для подсчета концентрации. От 5 крыс-доноров получали 5 мл цельной крови или 2 мл ОТЛП. Для терапевтических целей использовали полученную ОТЛП, разведенную до концентрации 1×10^9 в 1 мл обедненной тромбоцитами плазмы.

Для получения культуры аллогенных МСК у крыс-доноров острым путем выделяли фрагменты жировой клетчатки (вентральный компонент жировой клетчатки – забрюшинная, околопочечная клетчатка и сальник) в объеме 3–5 мл, после чего в специальных условиях осуществляли выделение и культивирование МСК

по стандартным методикам [19–21]. Для трансплантации использовали культуры второго пассажа с дозой клеток до 500 тыс/мл общим объемом не менее 3 мл. Оценку фенотипа клеток проводили путем изучения экспрессии поверхностных маркеров на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США). Культура МСК ЖТ содержала относительное число клеток, экспрессирующих маркер CD 44 – более 90%, CD 90 – более 90%, CD 105 – более 90%, CD 73 – более 90%, CD 54 – более 90%, CD 116 – более 90%, CD 13 – более 90%; CD 31 – менее 5%, CD 34 – менее 5% и CD 45 – менее 5%, CD 117 – менее 5%, CD 14 – менее 5% [22–24].

Для определения площади раневой поверхности во время наблюдения ее фотографировали с лимитированного расстояния цифровой фотокамерой на фоне стандартной линейки. Изображения переносили на компьютер, калибровали и измеряли площадь поражения с помощью компьютерной программы Scion Image 4.0.3.2 (NIH, Scion Corporation, USA) [Scion Image 4.0.3.2]. Для анализа использовали как абсолютные значения измеряемой площади раневой поверхности, измеряли скорость эпителизации раневого дефекта. В проведенном экспериментальном исследовании расчеты выполняли по методу О.А. Навакатиняна в модификации К.М. Фенчина (1979), применяемому для определения площади и скорости уменьшения плоскостных ран [25]. На момент начала лечения площадь раны промежности лабораторных животных после моделирования процесса составила $Me=4,02 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=3,19-4,85 \text{ см}^2$). Динамику уменьшения площади раны в ходе заживления оценивали в процентах по формуле:

$$Y_t = 100 \times (S_o - S_t) / S_o,$$

где S_o – начальная площадь раны, S_t – ее площадь на день t .

Для исследования клеточного состава экссудата изучали мазки-отпечатки с раны по М.П. Покровской и М.С. Макарову (1942) [26]. В соответствии с показателями мазка-отпечатка вычисляли регенераторно-дегенеративный индекс Ю.А. Давыдова (1999) [27, 28]:

$$\text{РДИ} = (\text{ПЯН} + \text{СЯН}) / \text{ДФН},$$

где ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы; СЯН – сегментоядерные нейтрофилы; ДФН – дегенеративные нейтрофилы в поле зрения [27, 28].

Для гистологического исследования после выведения животного из эксперимента забирали тканевую лоскут, включающий мягкие ткани в зоне хронической раны с прилежащим участком терминального отдела прямой кишки, и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 48 ч. Затем промывали в проточной воде в течение 24 ч., обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70%, 80%, 96%, абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали серийные парафиновые срезы с использованием стекол, обработанных поли-L-лизинном на микротоме Leica RM 2125 RT толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином [29].

При статистической обработке результатов исследования использовали пакет программ Statistica 64 version 12 (2014) (StatSoft Inc., США). Ненормальный характер



распределения в выборках потребовал для сравнения групп использования непараметрических методов: для парного сравнения независимых групп по одному показателю использовали U тест Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test), при сравнении трех и более показателей – тест Краскела – Уоллиса (H-критерий Kruskal – Wallis ANOVA); сравнение двух зависимых групп по одному признаку проводили с помощью критерия Вилкоксона (Wilcoxon) с поправкой Бонферрони, трех и более – на основании метода Фридмана (Friedman ANOVA), для оценки категориальных данных – критерия χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе животных Г (группе плацебо-контроля) во всех случаях сроки регенерации превышали месячный период, составив в среднем 35,0 суток [$Me, Q_{25-75} = 33,0-38,0$] (рис. 1). На 5-е сутки от начала отсчета наблюдения в зоне моделированной раны сохранялись признаки хронического воспаления: зияние ануса, рубцовое изменение и подрытость краев кожной раны, высланной рыхлыми пиогрануляциями и покрытой тканевым детритом. Средняя площадь раневой поверхности в этот период составляла $Me = 4,03 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75} = 3,77-4,29$), достоверно не отличаясь от исходного уровня ($p > 0,05$). Гистологически на 5-е сутки в зоне раны в нижней трети дермы, подкожной жировой клетчатке и мышцах наблюдался распространенный многоклеточный фиброз (рис. 2). Волокнистый компонент был выражен незначительно, преобладал клеточный компонент. Фибробласты и фиброциты образовывали скопления, диффузно или поодиночке в тканях располагались профибробласты, лимфоциты, сегментоядерные лейкоциты. Отмечалась очаговая спазмированность артерий. Выявлялись диапедезные кровоизлияния перифокально зоны фиброза. В препаратах установлены небольшие участки склерозирования. Диффузно во всех слоях выявлялось умеренно выраженное очаговое продуктивное воспаление. В мазках-отпечатках ран у 53,3% животных выявлен воспалительный, у 46,7% – воспалительно-регенеративный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,67 (1,44–1,88) [$Me (Q_{25}-Q_{75})$], достоверно не отличаясь от исходного уровня.

К 8-м суткам макроскопические изменения со стороны раны минимальны: анус зияет, в ране по-прежнему много некротических масс и детрита, перифокальные ткани инфильтрированы и болезненны (животное активно реагирует на пальпацию). Средняя площадь раневой поверхности в этот период составляла $Me = 4,01 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75} = 3,9-4,11$), достоверно не отличаясь от исходного уровня и предыдущего срока ($p > 0,05$). Гистологически в микропрепаратах со стороны краев раны выявляли многослойный плоский ороговевающий эпителий, многослойный плоский неороговевающий эпителий (в переходной зоне), дерму и колоректальный эпителий. В слизистой и подслизистой колоректальной зоны отмечены кровоизлияния и умеренно выраженное продуктивное воспаление тканей. В перианальной области (кожная зона) располагается участок густоклеточного фиброза (рис. 3). Преобладал клеточный компонент, волокнистый компонент был выражен слабо. Отмечены многочисленные диапедезные кровоизлияния в тканях. В мышечном слое зарегистрирована очаговая атрофия мышечных волокон. В мазках-отпечатках ран у половины животных выявлен воспалительный, у другой половины – воспалительно-регенеративный

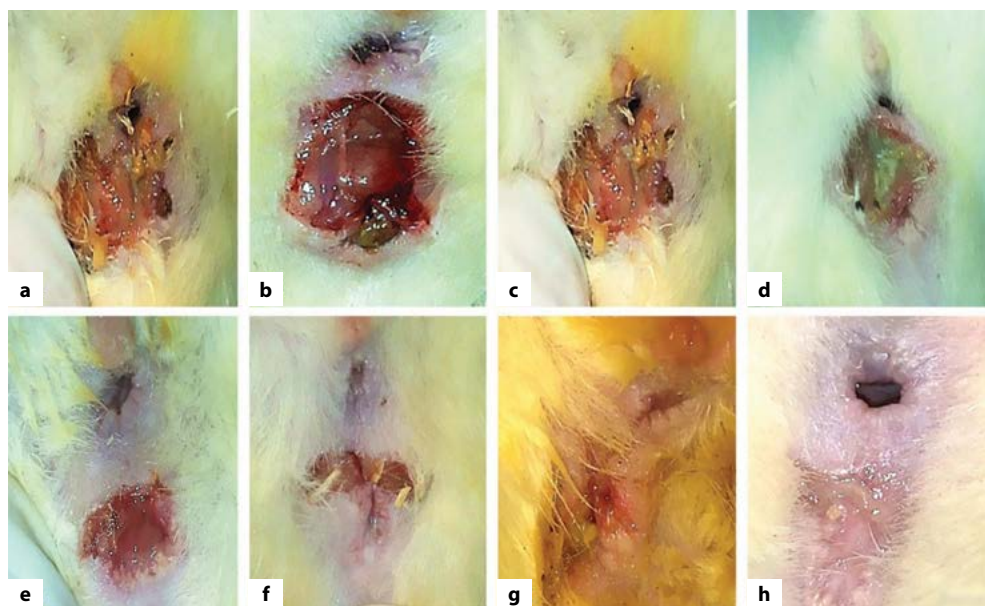


Рис. 1. Внешний вид области хронической раны животных контрольной серии в различные сроки ее регенерации: а – 5-е сутки; б – 8-е сутки; с – 12-е сутки; д – 14-е сутки; е – 20-е сутки; ф – 25-е сутки; г – 28-е сутки; h – 35-е сутки

Fig. 1. The appearance of the chronic wound area of animals of the control series at various times of its regeneration: а – 5th day; б – 8th day; с – 12th day; д – 14th day; е – 20th day; ф – 25th day; г – 28th day; h – 35th day

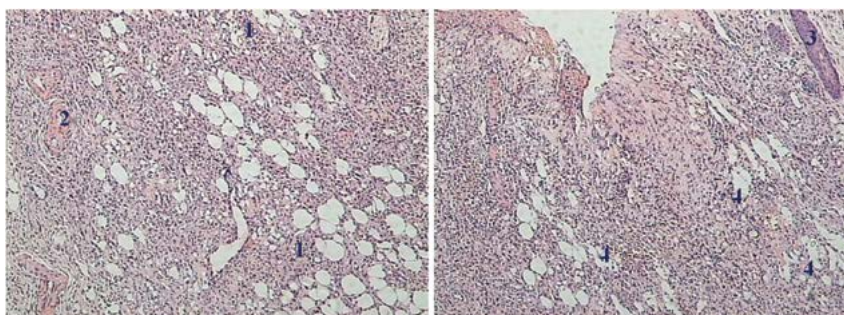


Рис. 2. Гистологическое исследование ткани промежности в зоне хронической раны у лабораторных животных контрольной серии (Г) на 5-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Примечания: 1 – распространенный многоклеточный фиброз; 2 – спазмированные сосуды; 3 – диапедезные кровоизлияния; 4 – участки склерозирования.

Fig. 2. Histological examination of the perineal tissue in the area of a chronic wound in laboratory animals of the control series (D) on the 5th day of observation. Stained with hematoxylin and eosin, magnification $\times 100$

Notes: 1 – widespread multicellular fibrosis; 2 – spasmodic vessels; 3 – diapedesis hemorrhages; 4 – sclerosis sites.



тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенеративно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,62 (1,07–2,17) [Me (Q_{75} – Q_{95})], достоверно не отличаясь от предшествующего срока оценки (Wilcoxon $Z=0,078446$, $p=0,937473$).

К 12-м суткам по-прежнему отмечено зияние ануса с его функциональной недостаточностью (неполное удержание каловых масс), в ранах большинства животных исчезло значительное количество детрита при сохранении множественных пиогрануляций. Уменьшились перивульнарная инфильтрация тканей и степень реакции на их пальпацию. Средняя площадь раневой поверхности в этот период составляла $Me=3,44 \text{ см}^2$ (Q_{25} – $Q_{75}=2,98$ – $3,90$), что было достоверно меньше исходного уровня (Wilcoxon $Z=2,155743$, $p=0,031105$) и предыдущего срока (Wilcoxon $Z=2,852548$, $p=0,004337$). В гистологических препаратах в этот срок отмечено сохранение степени дегенеративно-воспалительных изменений с участками дистрофии плоского ороговевающего эпителия, отеком и разрыхлением сетчатого слоя дермы. Выявлялись мелкофокусные диапедезные кровоизлияния, единичные очаги пролиферации фибробластов. В мазках-отпечатках ран у 2/3 животных зарегистрирован воспалительно-регенеративный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,02 (0,34–1,70) [Me (Q_{75} – Q_{95})], что было достоверно ниже предшествующего уровня оценки (Wilcoxon $Z=1,717812$, $p=0,085832$).

К 14-м суткам визуальные признаки воспалительной реакции уменьшились: несмотря на сохраняющийся парез замыкательного аппарата прямой кишки в ране существенно уменьшилось количество некротических масс и детрита, практически исчезла инфильтрация перифокальных тканей с отсутствием реакции животного на их пальпацию. Отмечены начальные признаки эпителизации (со стороны анального канала). Средняя площадь раневой поверхности в этот период уменьшилась

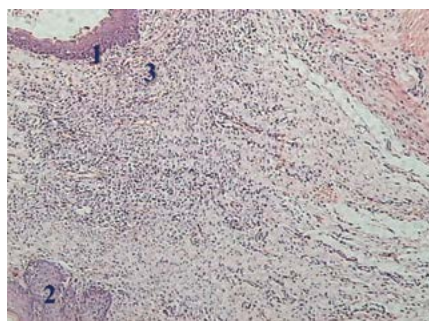


Рис. 3. Гистологическое исследование ткани промежности в зоне хронической раны у лабораторных животных контрольной серии (Г) на 8-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Примечания: 1 – фиброз; 2 – кровоизлияния; 3 – лейкоцитарная инфильтрация тканей.

Fig. 3. Histological examination of the perineal tissue in the area of a chronic wound in laboratory animals of the control series (D) on the 8th day of observation. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 100$

Notes: 1 – fibrosis; 2 – hemorrhages; 3 – leukocyte infiltration of tissues.

и составила $Me=2,10 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=1,01-3,19$; Wilcoxon $Z_{5-15 \text{ сутки}}=3,350975$, $p=0,000805$ и Wilcoxon $Z_{12-15 \text{ сутки}}=3,350975$, $p=0,000805$). При гистологическом исследовании тканей в зоне раны выявлена обширная зона многоклеточной фиброзной ткани в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя с формированием межтканевых пустот в области дна и краев раны. В ране выявлялись очаги фиброза разной степени зрелости: в менее зрелых участках преобладали про- и фибробласты, в более зрелых – фибробласты и фиброциты. Волокнистый компонент раны был представлен меньше клеточного. Коллагеновые волокна были укорочены и утолщены, иногда носили гомогенный вид или были тонкими и извитыми. В мышечном слое наблюдались локусы некроза мышечных волокон, отмечались мелкие участки склерозирования ткани. В 16,7% наблюдений у животных контрольной серии в паравульварной зоне выявлены сформированные микро- и макроабсцессы (рис. 4). В мазках-отпечатках ран к этому сроку у 3/4 животных зарегистрирован воспалительно-регенеративный тип цитограммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 0,94 (0,31–1,57) [$Me (Q_{25}-Q_{75})$], что было в 1,78 раза меньше, чем на 5-е сутки наблюдения (Wilcoxon $Z=1,991741$, $p=0,046400$).

Начиная с 15-х суток после начала плацебо-лечения в контрольной серии отмечено медленное сокращение раневой поверхности с постепенной ее регенерацией. С этого периода в хронической ране отмечены уменьшение глубины раны с сокращением ее размеров и снижение экссудации, «языки» краевой эпителизации (более выраженные со стороны анального канала), постепенное появление полноценных грануляций. Отмечалось постепенное восстановление тонуса мышц анального сфинктера, хотя в определенной мере этот процесс полностью не восстановился у 1/3 животных даже к моменту полной эпителизации ран (к 35-м суткам). При гистологическом исследовании тканей в зоне раны в динамике отмечено разрастание многоклеточной фиброзной ткани (больше в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя). В ране выявлялись очаги фиброза разной

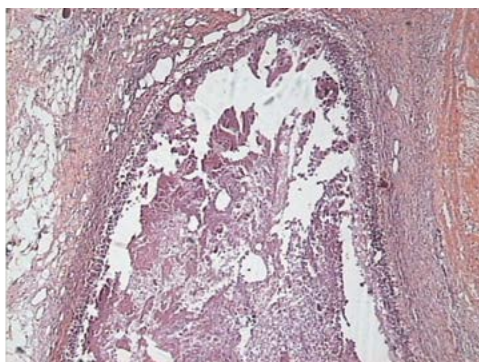


Рис. 4. Гистологическое исследование ткани промежности в зоне хронической раны у лабораторных животных контрольной серии (Г) на 14-е сутки наблюдения – паравульварный абсцесс с двухслойной стенкой. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 50$

Fig. 4. Histological examination of the perineal tissue in the area of a chronic wound in laboratory animals of the control series (D) on the 14th day of observation – a paravulvar abscess with a two-layer wall. Stained with hematoxylin and eosin, magnification $\times 50$



степени зрелости – фибробласты и фиброциты, с постепенным превалированием волокнистого компонента над клеточным (при этом коллагеновые волокна приобретали обычную структуру). В мышечном слое в зонах бывшего некроза мышечных волокон формировались очаги склерозирования ткани. Постепенно очаги эпителизации приобретали циркулярно наползающий характер с завершением этого процесса у большинства животных к 35-м суткам от начала плацебо-лечения. Начиная с 15-х суток в мазках-отпечатках ран отмечена четкая тенденция к постепенной трансформации регенераторно-воспалительного типа в стойкий регенераторный вариант цитогаммы.

После 15–18-х суток в мазках-отпечатках отсутствовали некротические ткани и детрит, четко выявлялись нити фибрина, постепенно снижалось число нейтрофильных лейкоцитов с появлением и прогрессивным увеличением в цитогамме молодых и зрелых полибластов, фибробластов и лимфоцитов, а также эпителиоцитов. С 20-х суток в цитограммах фиксировался завершенный фагоцитоз. Единичная микрофлора располагалась преимущественно внутриклеточно, дегенеративные формы нейтрофилов отсутствовали. К 28–30-м суткам в мазках-отпечатках отмечалась четкая трансформация полибластов в профибробласты и фибробласты,

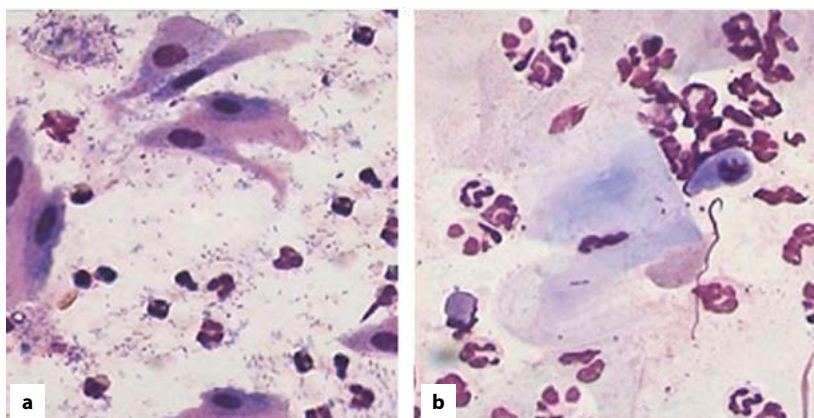


Рис. 5. Мазки-отпечатки с ран промежности лабораторных животных контрольной серии (Г) на 18-е (а) и 28-е (б) сутки наблюдения. Окраска по Романовскому – Гимзе, ув. ×1000

Примечания: а – в мазке нет некротической ткани и детрита; нейтрофилы без признаков деструкции; молодые и зрелые полибласты, фибробласты и лимфоциты; микрофлора преимущественно находится внутриклеточно; регенераторно-воспалительный тип цитогаммы; б – в препарате волокна фибрина, эпителиоциты; отсутствуют дегенеративные формы нейтрофилов; значительное количество полибластов, фибробластов и лимфоцитов; отсутствует микрофлора; регенераторный тип цитогаммы.

Fig. 5. Smears-prints from the perineal wounds of laboratory animals of the control series (D) on the 18th (a) and 28th days (b) of observation. Coloring according to Romanovsky – Gimza, magnification ×1000

Notes: a – there is no necrotic tissue and detritus in the smear; neutrophils without signs of destruction; young and mature polyblasts, fibroblasts and lymphocytes; microflora is mainly located intracellularly; regenerative-inflammatory type of cytogram; b – fibrin fibers, epithelial cells in the preparation; there are no degenerative forms of neutrophils; a significant number of polyblasts, fibroblasts and lymphocytes; there is no microflora; regenerative type of cytogram.

встречаемых одиночно и группами (рис. 5). К 28–30-м суткам рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы еще в большей степени снизился, достигнув уровня 0,63 (0,46–0,80) [Me ($Q_{25}-Q_{75}$)].

Степень микробной контаминации ран коррелировала с динамикой дегенеративно-воспалительных изменений в хронических ранах животных контрольной серии. На 5-е сутки в группе плацебо-контроля инфицирование ран достоверно уменьшилось с $3,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^7$) до $1,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=0,251106$, $p=0,801732$). Также статистически незначимым было уменьшение микробной контаминации ран к 8-м суткам – с $1,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$) до $5,0 \times 10^5$ ($5,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^6$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=1,422574$, $p=0,154861$). К 12-м суткам уровень инфицирования ран, хотя и несколько снизился, статистически не различался с предшествующим уровнем оценки (Wilcoxon $Z=0,473879$, $p=0,635586$) и исходной степени микробной контаминации (Wilcoxon $Z=1,836282$, $p=0,066317$). Лишь к 14-м суткам уровень инфицирования ран животных контрольной группы снизился в 100 раз по сравнению с исходным состоянием и в 16,7 раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (Wilcoxon $Z=1,991741$, $p=0,046400$). К 30-м суткам количество КОЕ в 1 мл смыва с ран животных контрольной серии составил $1,5 \times 10^2$ ($0-5,0 \times 10^2$) – в 20 000 раз ниже по сравнению с исходным уровнем (Wilcoxon $Z=1,991741$, $p=0,046400$).

В группе животных А, в которой на область хронической раны осуществляли однократное воздействие расфокусированным лазерным излучением, динамика регенерации ран характеризовалась непродолжительным заживлением, существенно отличающимся от спонтанного заживления и сроков регенерации ран в контрольной серии. Во всех случаях время эпителизации варьировало от 8 до 21 дня, составив в среднем 19 суток [Me, $Q_{25}-Q_{75}=9,0-13,0$]. Сразу после лазерного воздействия в ране формировался нежный коагуляционно-пептидный струп (в виде неоднородной тонкой пленки), и в последующем регенерация раны проходила «под струпом», без выраженной экссудативной реакции (рис. 6).

На 5-е сутки от начала отсчета наблюдения (рис. 7) в зоне моделированной раны признаки хронического воспаления, по сравнению с исходным состоянием, уменьшились: зияние ануса отсутствует, инфильтрация паравульнарных тканей минимальная (реакция животных на их пальпацию незначительная). Коагуляционный струп к этому сроку становится более плотным, фиксация его к раневой поверхности усиливается. Средняя площадь раневой поверхности у животных группы А в этот период составляла Me=4,02 см² ($Q_{25}-Q_{75}=3,77-4,29$), достоверно не отличаясь от исходного уровня (Wilcoxon $Z=0,042857$, $p=0,965815$). Гистологически на 5-е сутки в сетчатом слое раны наблюдались признаки продуктивного воспаления. Отмечалась обширная зона многоклеточного (зреющего) фиброза с умеренным и/или слабым диффузно-очаговым продуктивным воспалением. Среди клеток зоны фиброза – фиброциты, фибробласты, профибробласты, в меньшем количестве – лимфоциты, плазматические клетки, единичные эозинофилы и сегментоядерные лейкоциты. В краевой зоне большое количество участков многослойного плоского ороговевающего эпителия, прилежащего к дерме и подкожно-жировой клетчатке. В ране выявлено достаточное количество тонких коллагеновых волокон, располагающихся хаотично или циркулярно. Отмечены мелкие очаги склероза. В ряде вен наблюдались немногочисленные смешанные тромбы, в артериях – набухание и десквамация

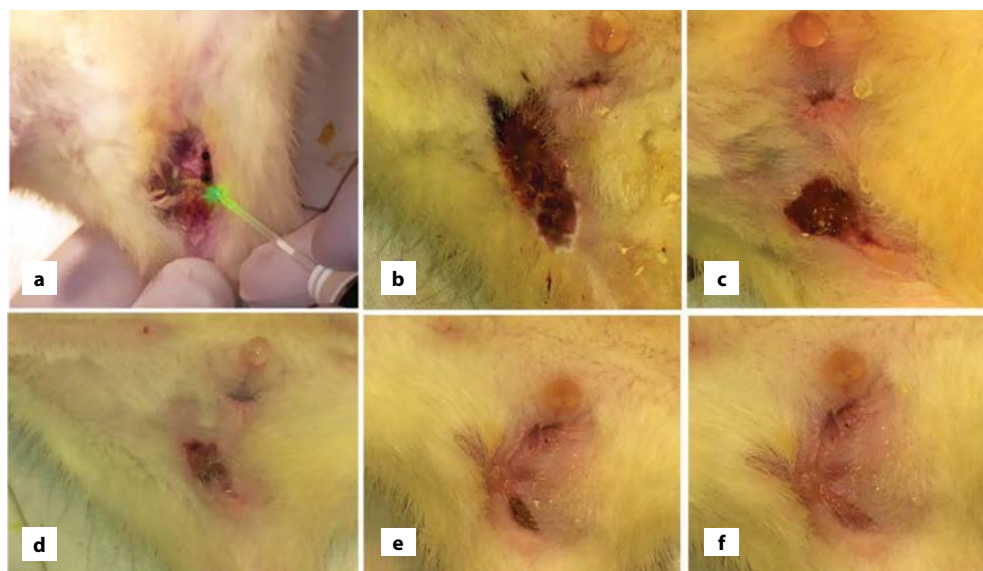


Рис. 6. Внешний вид области хронической раны животных в различные сроки ее регенерации после воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения (группа А): а – процесс обработки раны лазерным излучением после удаления детрита; б – вид раны сразу после обработки лазером; с – вид раны на 5-е сутки; д – вид раны на 12-е сутки; е – вид раны на 14-е сутки; ф – вид промежности животного на 19-е сутки после лазерного воздействия (рана полностью эпителизирована)

Fig. 6. Appearance of the area of chronic animal wounds at various times of its regeneration after exposure to high-intensity laser radiation (group A): а – the process of treating the wound with laser radiation after detritus removal; б – the type of wound immediately after laser treatment; с – the type of wound on the 5th day; д – the type of wound on the 12th day; е – the type of wound on the 14th day; ф – the type of perineum of the animal on the 19th day after laser exposure (the wound is completely epithelialized)

эндотелиальных клеток. В мазках-отпечатках ран к этому сроку у 29,2% животных выявлен воспалительный, у 58,3% – воспалительно-регенеративный, у 12,5% – регенераторный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,62 (1,04–2,21) [Me (Q_{25} – Q_{75})], достоверно не отличается от исходного уровня (Wilcoxon $Z=0,842857$, $p=0,399309$).

К 8-м суткам макроскопические изменения со стороны раны минимальны: анус в тонусе, рана по-прежнему покрыта цельным эластичным струпом, перифокальные ткани не инфильтрированы и не болезненны (животное не реагирует на их пальпацию). Средняя площадь раневой поверхности в этот период составляла Me=4,01 см² (Q_{25} – Q_{75} =3,9–4,11), достоверно не отличаясь от исходного уровня (Wilcoxon $Z=0,0434471$, $p=0,663947$). Гистологически в микропрепаратах со стороны краев раны выявляли пласты многослойного плоского ороговевающего эпителия, в переходной зоне – участки многослойного плоского неороговевающего эпителия и колоректального эпителия. В слизистой и подслизистой колоректальной зоны незначительно выраженное продуктивное воспаление тканей. В перианальной области

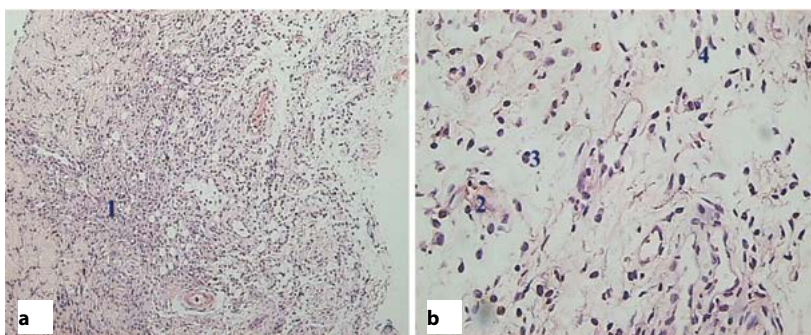


Рис. 7. Гистологические изменения в области хронической раны промежности у лабораторных животных группы А на 5-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином: а – ув. $\times 100$, б – ув. $\times 400$

Примечания: 1 – зона фиброза; 2 – фиброциты; 3 – лимфоциты; 4 – фибробласты.

Fig. 7. Histological changes in the area of chronic perineal wound in laboratory animals of group A on the 5th day of observation. Staining with hematoxylin and eosin (a – magnification $\times 100$, b – magnification $\times 400$)

Notes: 1 – fibrosis zone; 2 – fibrocytes; 3 – lymphocytes; 4 – fibroblasts.

(кожная зона) выявлены очаги фиброза, при этом в них клеточный компонент незначительно превалировал над волокнистым. Также имело место небольшое число диапедезных кровоизлияний. Встречались очаги атрофии мышечных волокон. В мазках-отпечатках ран у 52,4% животных выявлен воспалительно-регенеративный, у 47,6% – регенеративный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенеративно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,01 (1,07–2,17) [Me (Q_{75} – Q_{95})], достоверно снизившись по сравнению с исходным уровнем на 40,9% (Wilcoxon $Z=3,076052$, $p=0,002098$).

К 12-м суткам у всех животных данной серии отмечена полная функциональная состоятельность анального сфинктера, раны визуально и по объективным признакам уменьшились в размерах. При этом эпителизация происходила со всех сторон по окружности раны (в большей степени со стороны анального канала). Перивульнарная инфильтрация тканей и реакция на их пальпацию у животных в этот срок наблюдения отсутствовала. Средняя площадь раневой поверхности в этот период составила $Me=3,44 \text{ см}^2$ (Q_{25} – $Q_{75}=2,98$ – $3,90$), что было достоверно меньше исходного уровня (Wilcoxon $Z=2,155743$, $p=0,031105$) и предыдущего срока (Wilcoxon $Z=2,852548$, $p=0,004337$). В гистологических препаратах в этот срок отмечено уменьшение степени дегенеративно-воспалительных изменений с меньшей степенью дистрофии плоского ороговевающего эпителия, отека тканей и разрыхления сетчатого слоя дермы. Выявлялись единичные мелкофокусные диапедезные кровоизлияния и очаги пролиферации фибробластов. В микропрепаратах – многослойный плоский ороговевающий эпителий, дерма (кожная зона) с многочисленными волосными фолликулами и сальными железами без видимых гистопатологических изменений. В переходной зоне выявлен участок многоклеточного фиброза: округлые вытянутые



клетки со светлой цитоплазмой – профибробласты, фибробласты, лимфоциты и макрофаги. Коллагеновые волокна утолщенные, нередко гомогенизированы. Сохраняются умеренный отек соединительной ткани с расширением гемо- и лимфокапилляров, перикапиллярный отек с очаговой атрофией мышечных волокон и мелкими участками склерозирования (рис. 8). В мазках-отпечатках ран у половины животных зарегистрирован воспалительно-регенеративный, у второй половины – регенеративный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенеративно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 0,79 (0,52–1,00) [Me ($Q_{75}-Q_{95}$)], что было достоверно ниже исходного уровня (Wilcoxon $Z=1,717812$, $p=0,085832$).

В ране выявлялись очаги фиброза разной степени зрелости: в менее зрелых участках преобладали про- и фибробласты, в более зрелых – фибробласты и фиброциты. Волокнистый компонент раны был представлен в равной степени с клеточным. В ряде мест коллагеновые волокна были несколько укорочены и утолщены, в ряде мест они носили гомогенный вид или были тонкими извитыми. Отмечались мелкие участки склерозирования ткани.

В мазках-отпечатках ран к этому сроку у всех животных зарегистрирован регенеративный тип цитогаммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенеративно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 0,64 (0,59–0,69) [Me ($Q_{25}-Q_{75}$)], что было на 62,6% меньше, чем перед началом лечения (Wilcoxon $Z=3,407771$, $p=0,000655$).

К 19-м суткам у 8 животных (66,7%) рана была полностью закрыта (эпителизована). Только у 4 животных (33,3%) раны имели вид «несомкнувшейся» щели с неполной эпителизацией Me=0 (0–0,12). При гистологическом исследовании тканей в зоне эпителизованной раны в этом сроке отмечено разрастание многоклеточной

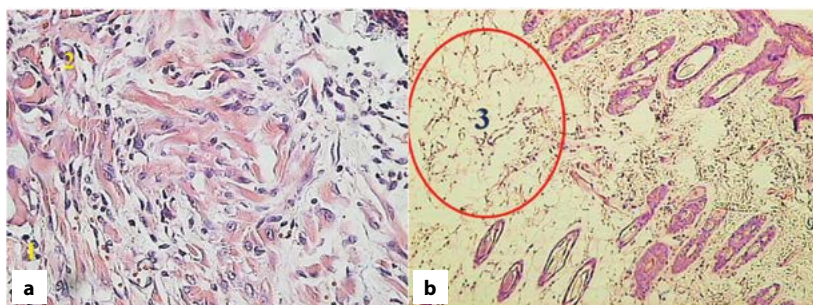


Рис. 8. Гистологическое исследование ткани промежности в зоне хронической раны у лабораторных животных группы А на 12-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином: а – ув. $\times 400$; б – ув. $\times 200$

Примечания: 1 – лимфоциты; 2 – макрофаги.

Fig. 8. Histological examination of perineal tissue in the area of a chronic wound in laboratory animals of group A on the 12th day of observation. Stained with hematoxylin and eosin: a – magnification $\times 400$; b – magnification $\times 200$

Notes: 1 – lymphocytes; 2 – macrophages.

фиброзной ткани (больше – в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя). При этом волокнистый компонент соединительной ткани превалировал над клеточным (коллагеновые волокна приобретали обычную для себя структуру). В мышечном слое в зонах очагов предшествовавшего некроза мышечных волокон формировались участки склерозирования ткани. Начиная с 9–10-х суток в мазках-отпечатках ран отмечено превалирование регенераторного варианта цитогаммы с достоверным прогрессивным снижением регенеративно-дегенеративного индекса Давыдова у лабораторных животных этой группы. При этом наиболее значимое снижение данного показателя в отношении к исходному уровню отмечено к 8-м (Wilcoxon $Z=3,076052$, $p=0,002098$), 12-м (Wilcoxon $Z=3,505804$, $p=0,000455$), 14-м (Wilcoxon $Z=3,407771$, $p=0,000655$) и 19-м суткам (Wilcoxon $Z=2,201398$, $p=0,027709$).

Степень микробной контаминации ран после лазерного воздействия коррелировала с динамикой дегенеративно-воспалительных изменений в хронических ранах животных серии А. При этом сразу после лазерного воздействия раны были свободны от микроорганизмов (полная микробная деконтаминация под воздействием лазерного излучения). Начиная со вторых суток после лазерного воздействия в ранах большинства животных выявлялось различное содержание формирующих колонии микробов. Так, на 5-е сутки инфицирование ран было в 60 раз менее выраженным по сравнению с исходным уровнем – микробная контаминация раны уменьшилась с $3,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^7$) до $5,0 \times 10^4$ ($5,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=3,107436$, $p=0,001887$). По сравнению с группой плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран после лазерной обработки на 5-е сутки была в 20 раз ниже (Mann – Whitney U Test $Z=-2,82051$, $p=0,004795$). К 8-м суткам инфицирование ран лазерной серии снизилось еще в большей степени по сравнению с исходным уровнем (в 100 раз) – с $3,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^7$) до $3,0 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^4$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=2,845147$, $p=0,004439$). По сравнению с группой плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран после лазерной обработки на 8-е сутки была в 1,91 раза ниже (Mann – Whitney U Test $Z=-2,48261$, $p=0,013040$). На 12-е сутки уровень инфицирования ран лазерной серии снизился весьма существенно (в 10 000 раз по сравнению с исходным уровнем, Wilcoxon $Z=2,665570$, $p=0,007686$). Медиана инфицирования раны в этот срок составила $3,0 \times 10^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=3,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^4$) КОЕ/мл, при этом в 11% наблюдений микробный рост в ранах отсутствовал. По сравнению с группой плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран после лазерной обработки на 12-е сутки была в 1750 раз ниже (Mann – Whitney U Test $Z=3,532086$, $p=0,000412$). К 14-м суткам у 66,7% животных посевы из ран микробного роста не дали. При этом медиана уровня инфицирования ран уменьшилась до 0 (Wilcoxon $Z=2,201398$, $p=0,027709$). В сравнении с группой плацебо-контроля (Г), где степень инфицирования ран в этот срок достигала уровня $3,0 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$), после лазерной обработки у доминирующего большинства животных посевы из ран не давали микробного роста (Mann – Whitney U Test $Z=-2,80224$, $p=0,005075$). К 19-м суткам посевы из ран, не заживших к этому сроку, микробного роста не дали. В контрольной серии медиана инфицирования ран в этот период составила $3,0 \times 10^4$ ($Q_{25}-Q_{75}=5,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^4$) КОЕ/мл.

В группе животных Б после введения в края и дно моделированной хронической раны аллогенных МСК ЖТ динамика регенерации такой раны характеризовалась ускоренным заживлением, существенно отличающимся от спонтанного заживления



ран при создании модели и сроков регенерации ран в контрольной серии. Во всех случаях сроки эпителизации варьировали от 9 до 20 дней, составив в среднем 14 суток [$Me, Q_{25-75}=10,5-17,5$] (рис. 9).

На 5-е сутки после введения МСК ЖТ в зоне раны признаки ее хронического воспаления по сравнению с исходным состоянием уменьшились: зияние ануса отсутствует, инфильтрация паравульнарных тканей минимальная (реакция животных на их пальпацию незначительная). Отмечены умеренная серозно-геморрагическая экссудация, гипертрофия краев раны с небольшими «язычками» краевой эпителизации, особенно выраженными вблизи мест введения клеточного препарата. Средняя площадь раневой поверхности у животных группы Б в этот период составляла $Me=3,86 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=3,12-3,99$), уменьшившись по сравнению с исходным уровнем на 3,98% (Wilcoxon $Z=2,428571$, $p=0,015159$). При этом скорость закрытия раневого дефекта в этом сроке превышала таковую как в группе Г плацебо-контроля (Mann – Whitney U Test $Z=2,309401$, $p=0,033326$), так и в группе А (Mann – Whitney U Test $Z=-2,30940$, $p=0,020922$). Гистологически на 5-е сутки в сетчатом слое раны наблюдались умеренно выраженные очаги продуктивного воспаления. Эпителий и верхний слой дермы

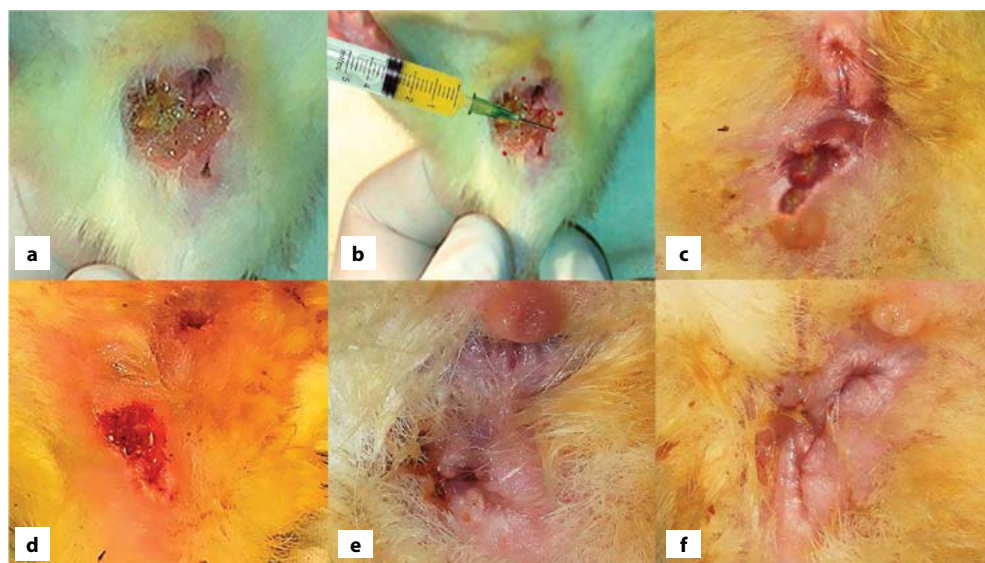


Рис. 9. Внешний вид области хронической раны животных в различные сроки ее регенерации после использования для лечения суспензии аллогенных МСК ЖТ (группа Б): а – вид хронической раны после удаления детрита; б – введение в края раны суспензии аллогенных МСК ЖТ; с – вид раны на 5-е сутки; д – вид раны на 8-е сутки; е – вид раны на 12-е сутки; ф – вид промежности животного на 14-е сутки после введения стволовых клеток (рана полностью сомкнута и эпителизирована)

Fig. 9. Appearance of the area of chronic animal wounds at various times of its regeneration after use for the treatment of suspension of allogeneic mesenchymal stem cells of adipose tissue (group B): а – type of chronic wound after detritus removal; б – introduction of suspension of allogeneic mesenchymal stem cells of adipose tissue into the wound edges; с – type of wound on the 5th day; д – type of wound on the 8th day; е – type of wound on the 12th day; ф – type of perineum of the animal on the 14th day after stem cell management (the wound is completely closed and epithelized)

перианальной области не имели видимых гистопатологических изменений. В сетчатом слое дермы обнаружена обширная зона многоклеточного (зреющего) фиброза с умеренным и/или слабым диффузно-очаговым продуктивным воспалением. Среди клеток зоны фиброза выявлялись фиброциты, фибробласты, профибробласты, в меньшем количестве – лимфоциты, плазматические клетки, единичные эозинофилы и сегментоядерные лейкоциты. В краевой зоне отмечено большое количество участков многослойного плоского ороговевающего эпителия, прилежащего к дерме и подкожно-жировой клетчатке. В мышечной зоне отмечены скопления малодифференцированных клеток в состоянии умеренно- и слабовыраженной деструкции (участки зернисто-глыбчатого распада мышечных волокон) с вакуолизацией или пенистостью цитоплазмы, лизисом ядер, маргинацией и конденсацией хроматина. В мазках-отпечатках ран к этому сроку у 16,7% животных выявлен воспалительный, у 45,8% – воспалительно-регенеративный, у 37,5% – регенераторный тип цитограммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,05 (0,97–1,11) [Me (Q_{25} – Q_{75})], значимо ниже исходного уровня (Wilcoxon $Z=3,414286$, $p=0,000640$).

К 8-м суткам макроскопические изменения со стороны раны были минимально выражены: анус в тонусе, рана существенно сомкнулась (при сохранении умеренной серозно-геморрагической экссудации), перифокальные ткани не инфильтрированы и не болезненны (животное не реагирует на их пальпацию). При этом в краевых участках раны отмечается выраженная гипертрофия эпидермиса с очагами, значимо возвышающимися над поверхностью кожи, как бы наползающими на раневую поверхность. Средняя площадь раны в этот период составляла Me=2,67 см² (Q_{25} – Q_{75} =2,32–3,21), достоверно уменьшившись на 33,6% по отношению к исходному уровню (Wilcoxon $Z=3,388871$, $p=0,000702$). Гистологически в микропрепаратах со стороны гипертрофированных краев раны выявляли пласты многослойного плоского ороговевающего эпителия, в переходной зоне – участки многослойного плоского неороговевающего эпителия и колоректального эпителия (рис. 10). В слизистой и подслизистой колоректальной зоны умеренно выраженное продуктивное воспаление тканей (с очагами гнойного воспаления). В кожной части перианальной области выявлены очаги фиброза, при этом в них клеточный компонент незначительно превалировал над волокнистым. Также имело место небольшое число диапедезных кровоизлияний. Встречались очаги атрофии мышечных волокон. В мышечном слое отмечены участки гиперцеллюлярности, клетки округлые или продолговатые, гипохромные, в том числе отдельные в состоянии деструкции. В дерме обнаружены участки выраженной эктазии и полнокровия вен, в участках клеточного фиброза преобладали фиброциты. В мазках-отпечатках ран у 57,1% животных выявлен воспалительно-регенеративный, у 42,9% – регенеративный тип цитограммы.

К 12-м суткам у всех животных данной серии отмечена полная функциональная состоятельность анального сфинктера, раны визуально и по объективным признакам существенно уменьшились в размерах (преимущественно за счет смыкания гипертрофированных кожных участков краевой зоны раны). При этом эпителизация происходила со всех сторон по окружности раны, а в 2 наблюдениях (11%) отмечено полное смыкание краев раны. Раневая экссудация, перивульнарная инфильтрация тканей и реакция на их пальпацию у животных в этот срок наблюдения

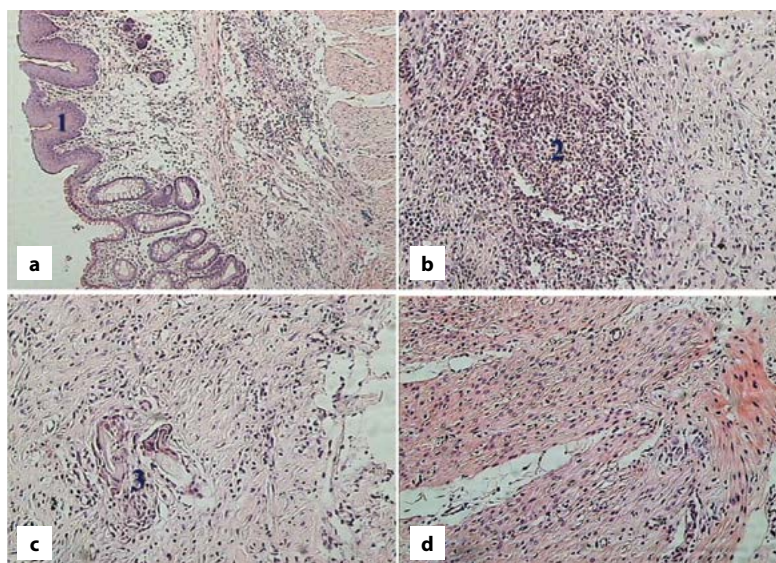


Рис. 10. Гистологические изменения в области хронической раны промежности у лабораторных животных группы Б на 8-е сутки наблюдения (пояснения в тексте). Окраска гематоксилином и эозином (ув. $\times 100$)

Примечания: 1 – колоректальный эпителий со стороны периаанальной части раны; 2 – очаговое гнойное воспаление с формированием микроабсцесса; 3 – участок фиброза.

Fig. 10. Histological changes in the area of chronic perineal wound in laboratory animals of group B on the 8th day of observation (explanations in the text). Staining with hematoxylin and eosin (magnification $\times 100$)

Notes: 1 – colorectal epithelium from the perianal part of the wound; 2 – focal purulent inflammation with the formation of a microabscess; 3 – fibrosis site.

отсутствовали. Средняя площадь раневой поверхности в этот период составила $Me=0,34 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=0,22-0,47$), что было достоверно меньше исходного уровня (Wilcoxon $Z=3,407771$, $p=0,000655$) и предыдущего срока (Wilcoxon $Z=3,723555$, $p=0,000196$). В гистологических препаратах в этот срок отмечено значимое уменьшение степени дегенеративно-воспалительных изменений. В краевой зоне кожной части раны выявлены участки многоклеточной фиброзной ткани с наличием гигантских многоядерных клеток. В прилегающей к ране подкожной жировой клетчатке сохраняются очаги клеточной инфильтрации, состоящие из малодифференцированных округлых клеток с признаками деструкции и клеток фибробластного дифферона в участках фиброгенеза. По всей окружности раны сохранялись единичные мелкофокусные диапедезные кровоизлияния и очаги пролиферации фибробластов. В кожной зоне микропрепаратов – многослойный плоский ороговевающий эпителий, в дерме выявлены волосные фолликулы и сальные железы без видимых гистопатологических изменений. В переходной зоне отмечены участки многоклеточного фиброза с округлыми вытянутыми клетками со светлой цитоплазмой (профибробластами, фибробластами, лимфоцитами и макрофагами). В подкожной жировой

клетчатке также отмечены участки слияния липоцитов с образованием одиночных кистозоподобных полостей. В мазках-отпечатках ран у 27,8% животных выявлен воспалительно-регенеративный, у 72,2% – регенеративный тип цитограммы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 0,73 (0,58–0,89) [Me ($Q_{75}-Q_{95}$)], достоверно снизившись по сравнению с исходным уровнем на 57,3% (Wilcoxon $Z=3,680005$, $p=0,000233$) и на 14,1% – по сравнению с 8-ми сутками наблюдения (Wilcoxon $Z=1,154084$, $p=0,248466$).

К 14-м суткам у абсолютного большинства животных (80%) рана была полностью сомкнута и эпителизирована. Только у 3 животных раны имели вид узких щелей неровной формы небольших размеров с неполной эпителизацией. При этом медиана (Me) площади ран животных группы Б к этому сроку равнялась 0 ($Q_{75}-Q_{95}=0-0$). При гистологическом исследовании тканей в этой зоне отмечено разрастание многоклеточной тонковолокнистой фиброзной ткани (больше всего выраженное в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя). Зона регенерации раны покрыта многослойным плоским ороговевающим эпителием различной толщины. В области рубца наряду с фибробластами наблюдались многочисленные фиброциты с очагами скопления фибробластоподобных гиперхромных клеток. Сохранялись отек и разрыхление верхнего слоя дермы, в различных слоях отмечались единичные участки негустой лейкоцитарной инфильтрации тканей, периваскулярные инфильтраты с немногочисленными очагами разрушения мышечных волокон (рис. 11).

В целом степень микробной контаминации ран у животных серии Б после инъекционной трансплантации аллогенных МСК ЖТ коррелировала с динамикой в них

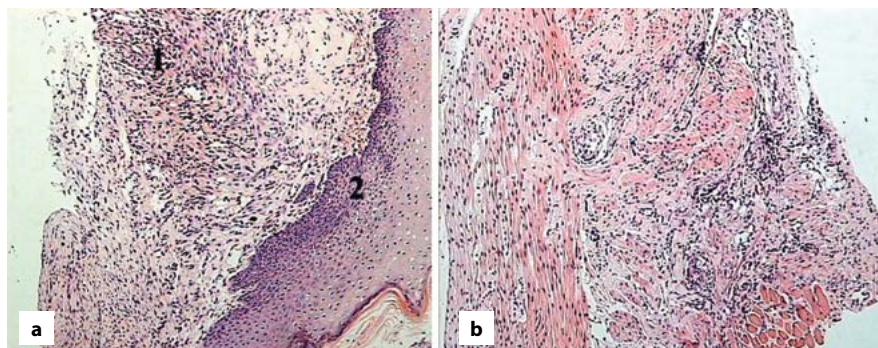


Рис. 11. Гистологические изменения в области хронической раны промежности у лабораторных животных группы Б на 14-е сутки наблюдения (пояснения в тексте). Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Примечания: 1 – многоклеточный фиброз; 2 – периваскулярный фиброз.

Fig. 11. Histological changes in the area of a chronic perineal wound in laboratory animals of group B on the 14th day of observation (explanations in the text). Staining with hematoxylin and eosin, magnification $\times 100$

Notes: 1 – multicellular fibrosis; 2 – perivascular fibrosis.



дегенеративно-воспалительных и регенеративных изменений. Вместе с тем в отличие от лазерной серии достаточно высокий уровень инфицирования ран сохранялся на существенном уровне сразу после введения клеточной суспензии МСК ЖТ и в более отдаленные сроки наблюдения. Так, на 5-е сутки инфицирование ран сохранялось на уровне $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл (Me; $Q_{75} - Q_{95} = 4,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл), уменьшившись в 3 раза по сравнению с исходным уровнем (Wilcoxon $Z = 2,101459$, $p = 0,035601$). В сравнении с группой плацебо-контроля (Г) уровни инфицирования ран после клеточной трансплантации на 5-е сутки достоверно не различались друг от друга (Mann – Whitney U Test $Z = 0,580693$, $p = 0,561448$). Степень микробной контаминации раны в этом сроке наблюдения в группе Б была недостоверно выше в сравнении с инфицированием ран после лазерного воздействия (группа А) (Mann – Whitney U Test $Z = 1,493210$, $p = 0,135383$). К 8-м суткам инфицирование ран после клеточной трансплантации снизилось еще в большей степени по сравнению с исходным уровнем (в 6 раз) – с $3,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^7$) до $5,0 \times 10^5$ ($4,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^5$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z = 2,497271$, $p = 0,012516$). Степень инфицирования ран после клеточной терапии на 8-е сутки достоверно не отличалась от группы плацебо-контроля (Г) (Mann – Whitney U Test $Z = 0,580693$, $p = 0,561448$), но была достоверно выше (в 16,7 раза), чем в лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z = -2,30940$, $p = 0,020922$). На 12-е сутки уровень инфицирования ран в группе Б снизился весьма существенно (в 100 раз по сравнению с исходным уровнем, Wilcoxon $Z = 2,520504$, $p = 0,011719$). Медиана инфицирования раны в этот срок составила $3,0 \times 10^4$ КОЕ/мл. По сравнению с группой плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран после лазерной обработки на 12-е сутки была в 16,7 раза ниже (Mann – Whitney U Test $Z = 2,075101$, $p = 0,037978$), но в 100 раз выше, чем в лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z = 3,532006$, $p = 0,000412$).

К 14-м суткам у 50% животных серии Б посевы из ран микробного роста не дали. При этом медиана уровня инфицирования ран в этом сроке уменьшилась до $1,5 \times 10^2$ КОЕ/мл (Wilcoxon $Z = 2,201398$, $p = 0,027709$). В сравнении с группой плацебо-контроля (Г), где степень инфицирования ран в этот срок достигала уровня $3,0 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$), после клеточной терапии в этом сроке у половины животных посевы из ран не давали микробного роста (Mann – Whitney U Test $Z = 2,802243$, $p = 0,005075$). Достоверных отличий инфицирования ран в группах А и Б в этот срок наблюдения выявлено не было (Mann – Whitney U Test $Z = -0,320256$, $p = 0,748774$).

Таким образом, инъекционное введение в дно и края моделированной хронической раны аллогенных МСК ЖТ позволяет существенно интенсифицировать процессы тканевой регенерации, значимо сокращая сроки уменьшения раневой поверхности и время эпителизации тканевого дефекта. При этом медиана полной регенерации хронической раны составляет 14 суток. Доказанный ранее длительный процесс функционирования инъекционно имплантированных мезенхимальных стволовых клеток с мощным паракринным эффектом [30] обуславливает достоверную стимуляцию регенераторных процессов в хронической ране, выраженную максимально в ее краевой зоне. Активная стимуляция ростовыми факторами прогенераторных клеток краевой области раны приводит к активной пролиферации эпителия, его горизонтальной миграции по направлению «от периферии – к центру» раневой поверхности. Вместе с тем обильная экссудативная реакция со стороны раны в начальном периоде заживления и достаточно сильно выраженная микробная контаминация не позволяют ране регенерировать в более короткие сроки, требуя дополнительного воздействия на микробиологическую составляющую этого процесса.

В группе животных В после введения в края и дно раны аллогенной обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы (L-PRP или ОТЛП) динамика регенерации такой раны характеризовалась ускоренным заживлением, значительно отличающимся от спонтанного заживления ран при создании модели и сроков регенерации ран в контрольной серии. Во всех случаях сроки эпителизации варьировали от 9 до 21 дня, составив в среднем 16 суток [Me, Q_{25-75} = 13,0–18,0] (рис. 12).

На 5-е сутки после введения ОТЛП в зоне раны признаки ее хронического воспаления по сравнению с исходным состоянием несколько уменьшились: зияние ануса отсутствует, инфильтрация паравульварных тканей минимальная (реакция животных на их пальпацию незначительная). Отмечены умеренная серозно-геморрагическая экссудация, в области краев раны небольшие «язычки» краевой эпителизации, особенно выраженные вблизи мест введения ОТЛП. Средняя площадь раневой поверхности у животных группы Б в этот период составляла Me = 3,86 см² ($Q_{25}-Q_{75}$ = 3,125–3,995), уменьшившись по сравнению с исходным уровнем на 3,98% (Wilcoxon Z = 2,371429, p = 0,017720). При этом скорость закрытия раневого дефекта

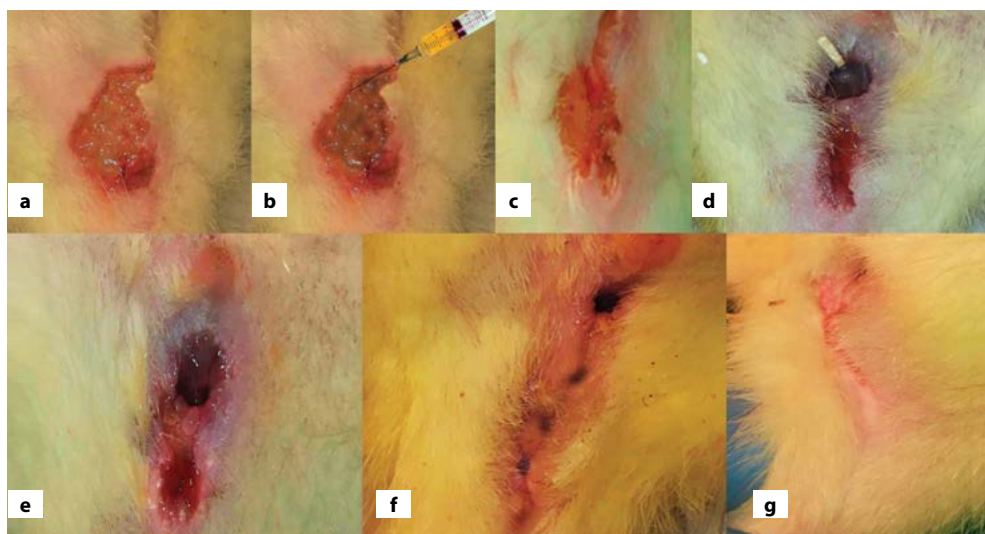


Рис. 12. Внешний вид области хронической раны животных в различные сроки ее регенерации после использования для лечения аллогенной плазмы, обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами (группа В): а – вид хронической раны до удаления детрита; б – введение в края раны после освобождения ее от тканевого детрита аллогенной L-PRP и лейкоцитами плазмы; с – вид раны на 5-е сутки; д – вид раны на 8-е сутки; е – вид раны на 12-е сутки; ф – вид промежности животного на 14-е сутки после введения L-PRP; г – вид промежности животного на 16-е сутки после введения L-PRP (рана полностью эпителизирована)

Fig. 12. Appearance of the area of chronic wounds of animals at various times of its regeneration after use for the treatment of allogeneic plasma enriched with platelets and leukocytes (Group C): а – type of chronic wound before removal of detritus; б – introduction into the edges of the wound after its release from tissue detritus of allogeneic L-PRP and leukocytes plasma; с – type of wound on the 5th day; д – type of wound on the 8th day; е – type of wound on the 12th day; ф – view of the perineum of the animal on the 14th day after the management of L-PRP; г – view of the perineum of the animal on the 16th day after the management of L-PRP (the wound is completely epithelialized)



в этом сроке превышала таковую как в группе Г плацебо-контроля (Mann – Whitney U Test $Z=2,226922$, $p=0,025953$), так и в группе А (Mann – Whitney U Test $Z=-2,227346$, $p=0,025925$) и статистически не отличалась от серии Б (Mann – Whitney U Test $Z=0,00$, $p=1,00$). Блок кожной зоны перианальной области на 5-е сутки, представленный для анализа, включал многослойный плоский ороговевающий и неороговевающий эпителий, дерму, подкожную жировую клетчатку и фрагмент мышечной ткани. Гистологически на 5-е сутки в сетчатом слое раны наблюдались умеренно выраженные участки продуктивного воспаления. Эпителий и верхний слой дермы перианальной области не имели видимых гистопатологических изменений. В сетчатом слое дермы обнаружена обширная зона многоклеточного (зреющего) фиброза с умеренным и/или слабым диффузно-очаговым продуктивным воспалением. Среди клеток зоны фиброза выявлялись фиброциты, фибробласты, профибробласты, в меньшем количестве – лимфоциты, плазматические клетки, единичные эозинофилы и сегментоядерные лейкоциты. В краевой зоне отмечено большое количество участков многослойного плоского ороговевающего эпителия, прилежащего к дерме и подкожно-жировой клетчатке. В ряде срезов отмечены выраженное диффузно-очаговое гнойное воспаление (распространяется до эпителиального слоя), периневральный отек, эктазии и полнокровие вен, выявлены немногочисленные участки некроза. В мазках-отпечатках ран к этому сроку у 19,1% животных выявлен воспалительный, у 47,6% – воспалительно-регенеративный, у 33,3% – регенераторный тип цитогранулы. В соответствии с показателями мазков-отпечатков рассчитанный регенеративно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 1,08 (0,99–1,15) [Me ($Q_{25}-Q_{75}$)], что значительно ниже исходного уровня (Wilcoxon $Z=3,314286$, $p=0,000919$).

К 8-м суткам макроскопические изменения со стороны раны были минимально выражены: анус в тонусе, рана существенно сомкнулась (при сохранении умеренной серозно-геморрагической экссудации), перифокальные ткани не инфильтрированы и не болезненны (животное не реагирует на их пальпацию). При этом в краевых участках раны отмечается невыраженная гипертрофия эпидермиса. Средняя площадь раны в этот период составляла Me=2,69 см² ($Q_{25}-Q_{75}=2,33-3,22$), достоверно уменьшившись на 33,1% по отношению к исходному уровню (Wilcoxon $Z=3,354113$, $p=0,000796$). Гистологически в микропрепаратах со стороны краев переходной зоны раны выявлены пласты многослойного плоского ороговевающего эпителия, в переходной зоне – участки многослойного плоского ороговевающего и неороговевающего эпителия и колоректального эпителия, со стороны ануса – колоректальный эпителий (рис. 13). В слизистой и подслизистой колоректальной зоны умеренно выраженное продуктивное воспаление тканей (с участками очагового гнойного воспаления). В кожной части перианальной области выявлены очаги фиброза, при этом в них клеточный компонент незначительно превалировал над волокнистым. Коллагеновые волокна неоднородные, тонкие и утолщенные, располагаются хаотично, очагово отмечается их распад или гомогенизация. Отмечено небольшое число диапедезных кровоизлияний. Встречались очаги атрофии мышечных волокон. В мышечном слое отмечены участки гиперцеллюлярности, клетки округлые или продолговатые, гипохромные, в том числе отдельные – в состоянии деструкции. В дерме обнаружены участки выраженной эктазии и полнокровия вен. В участках клеточного фиброза преобладали фиброциты, в мышцах выявлены многочисленные макрофаги.

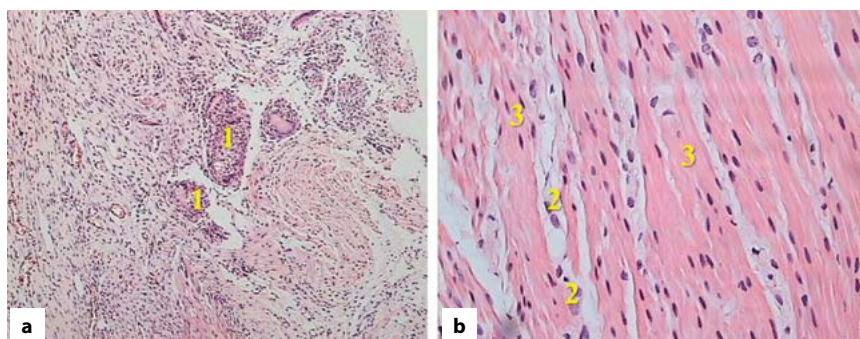


Рис. 13. Гистологические изменения в области хронической раны промежности у лабораторных животных группы В на 8-е сутки наблюдения (пояснения в тексте). Окраска гематоксилином и эозином: а – ув. $\times 100$; б – ув. $\times 400$

Примечания: 1 – очаги клеточного фиброза; 2 – макрофаги; 3 – мышечные волокна.

Fig. 13. Histological changes in the area of a chronic perineal wound in laboratory animals of group C on the 8th day of observation (explanations in the text). Staining with hematoxylin and eosin: a – uv. $\times 100$; b – uv. $\times 400$

Notes: 1 – foci of cellular fibrosis; 2 – macrophages; 3 – muscle fibers.

В мазках-отпечатках ран на 8-е сутки у 57,9% животных выявлен воспалительно-регенеративный, у 42,1% – регенеративный тип цитогаммы.

К 12-м суткам у всех животных данной серии отмечена полная функциональная состоятельность анального сфинктера, раны визуально и по объективным признакам существенно уменьшились в размерах (преимущественно – за счет «смыкания» кожных участков краевой зоны раны, частично – путем активной краевой эпителизации). Раневая экссудация, перивульварная инфильтрация тканей и реакция на их пальпацию у животных в этот срок наблюдения отсутствовали. Средняя площадь раневой поверхности в этот период составила $Me=0,43 \text{ см}^2$ ($Q_{25}-Q_{75}=0,29-0,49$), что было достоверно меньше исходного уровня (Wilcoxon $Z=3,407771$, $p=0,000655$) и предыдущего срока (Wilcoxon $Z=3,723555$, $p=0,000196$). В гистологических препаратах в этот срок отмечено значимое уменьшение степени дегенеративно-воспалительных изменений. В краевой зоне кожной части раны выявлены участки многоклеточной фиброзной ткани с наличием гигантских многоядерных клеток. В прилегающей к ране подкожной жировой клетчатке сохраняются очаги клеточной инфильтрации, состоящие из малодифференцированных округлых клеток с признаками деструкции и клеток фибробластного дифферона в участках фиброгенеза. По всей окружности раны сохранялись единичные мелкофокусные диапедезные кровоизлияния и очаги пролиферации фибробластов. В кожной зоне микропрепаратов – многослойный плоский ороговевающий и неороговевающий эпителий, в дерме видны волосные фолликулы и сальные железы без видимых гистопатологических изменений. В зоне кишечного эпителия сохраняются немногочисленные кровоизлияния. В переходной зоне отмечены участки многоклеточного фиброза с округлыми вытянутыми клетками со светлой цитоплазмой (профибробластами, фибробластами, лимфоцитами



и макрофагами). В мышечном слое кожной зоны очаги ангиогенеза: пролиферация гемо- и лимфокапилляров. Во всех слоях сохраняются очаги умеренного продуктивного воспаления. В мазках-отпечатках ран у 31,3% животных выявлен воспалительно-регенеративный, у 68,7% – регенеративный тип цитограммы. Рассчитанный регенераторно-дегенеративный индекс Давыдова у лабораторных животных этой группы составил 0,77 (0,64–0,88) [Me ($Q_{75}-Q_{95}$)], достоверно снизившись по сравнению с исходным уровнем на 55% (Wilcoxon $Z=3,680005$, $p=0,000233$) и на 11,5% – по сравнению с 8-ми сутками наблюдения (Wilcoxon $Z=0,631480$, $p=0,527727$).

К 14-м суткам у абсолютного большинства животных (40%) рана была полностью сомкнута и эпителизирована. Только у 9 (60%) животных раны имели вид ограниченных узких щелей неровной формы небольших размеров с неполной эпителизацией. При этом медиана (Me) площади ран животных группы Б к этому сроку равнялась 0,21 ($Q_{75}-Q_{95}=0-0,40$). При гистологическом исследовании тканей в области полностью эпителизированных и неэпителизированных ран в этом сроке зарегистрировано разрастание многоклеточной тонковолокнистой фиброзной ткани (наиболее выраженное в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя). При этом преобладали малодифференцированные клетки (профибробласты), меньше встречались фибробласты, наблюдались единичные фиброциты. Выявлены очаги скоплений фибробластоподобных гиперхромных клеток. Сохранялись отек и разрыхление дермы. В эндомизии мышечного слоя выявлены фокальный многоклеточный фиброз с превалированием периваскулярного фиброза. Наблюдались лимфоцитарные периваскулярные инфильтраты с очагами разрушения мышечных волокон.

Несмотря на то что к 19-м суткам у всех животных группы В раны были эпителизированы (так же как и в серии Б), проведена гистологическая оценка остаточных гистологических изменений тканей в области бывшего патологического субстрата. Макроскопически в этой зоне отмечался розовый, незначительно возвышающийся над поверхностью кожи рубец. При гистологическом исследовании тканей в этой зоне отмечено разрастание многоклеточной тонковолокнистой фиброзной ткани (больше всего выраженное в области сетчатого слоя дермы, подкожной жировой клетчатки и мышечного слоя). Зона регенерации раны покрыта многослойным плоским ороговевающим эпителием различной толщины. Под зоной эпителизации сохранялись отек и разрыхление верхнего слоя дермы, в различных слоях зоны регенерации отмечались единичные участки невыраженной лейкоцитарной инфильтрации тканей, периваскулярные инфильтраты с немногочисленными очагами разрушения мышечных волокон. Степень микробной контаминации ран у животных серии В после инъекционного введения аллогенной плазмы, обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами, коррелировала с динамикой в них дегенеративно-воспалительных и регенеративных изменений. Так же как и в серии Б, достаточно высокий уровень инфицирования ран сохранялся на существенном уровне сразу после введения аллогенной плазмы, обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами, и в более отдаленные сроки наблюдения. Так, на 5-е сутки инфицирование ран сохранялось на уровне $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл (Me; $Q_{75}-Q_{95}=3,0 \times 10^4 - 3,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), уменьшившись в 6 раз по сравнению с исходным уровнем (Wilcoxon $Z=2,165780$, $p=0,030328$). В сравнении с группой плацебо-контроля (Г) уровни инфицирования ран после введения L-PRP на 5-е сутки достоверно не различались друг от друга (Mann – Whitney U Test

$Z=-0,829561$, $p=0,406787$). Также не было статистически значимых различий в этом сроке по степени инфицирования ран в сравнении с группами А (Mann – Whitney U Test $Z=0,933257$, $p=0,350688$) и Б (Mann – Whitney U Test $Z=-0,435520$, $p=0,663186$). К 8-м суткам инфицирование ран после введения L-PRP снизилось еще в большей степени по сравнению с исходным уровнем (в 7,5 раза) – с $3,0 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^7$) до $4,0 \times 10^5$ ($4,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^5$) КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=2,497271$, $p=0,012516$). Степень инфицирования ран после использования ОТЛП на 8-е сутки достоверно не отличалась от группы плацебо-контроля (Г) (Mann – Whitney U Test $Z=-1,48825$, $p=0,136687$) и группы Б (Mann – Whitney U Test $Z=1,154701$, $p=0,248214$), но была выше (в 13,3 раза), чем в лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z=1,154701$, $p=0,020922$). На 12-е сутки уровень инфицирования ран в группе В снизился весьма существенно (в 100 раз по сравнению с исходным уровнем, Wilcoxon $Z=2,520504$, $p=0,011719$). Медиана инфицирования раны в этот срок составила $3,0 \times 10^4$ КОЕ/мл. По сравнению с группой плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран после лазерной обработки на 12-е сутки была в 16,7 раза ниже (Mann – Whitney U Test $Z=2,075101$, $p=0,037978$), но в 100 раз выше, чем в лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z=3,532006$, $p=0,000412$). При этом достоверных различий в инфицировании ран в группах Б и В выявлено не было (Mann – Whitney U Test $Z=0,220755$, $p=0,825283$).

К 14-м суткам у 33,3% животных серии В посевы из ран микробного роста не дали. При этом медиана уровня инфицирования ран в этом сроке уменьшилась до $1,0 \times 10^2$ КОЕ/мл (Wilcoxon $Z=2,201398$, $p=0,027709$), в то время как в группе плацебо-контроля (Г) степень инфицирования ран в этот срок достигала уровня $3,0 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^6$), что достоверно (в 300 раз) было выше, чем при использовании L-PRP (Mann – Whitney U Test $Z=2,802243$, $p=0,005075$). Достоверных отличий инфицирования ран в группах А, Б и В в этот срок наблюдения выявлено не было (Mann – Whitney U Test $Z=0,00 \dots 0,560449$, $p=0,575174 \dots 1,00$).

Таким образом, инъекционное введение в дно и края моделированной хронической раны аллогенной плазмы, обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами, позволяет существенно интенсифицировать процессы тканевой регенерации, значительно сокращая сроки уменьшения раневой поверхности и время эпителизации тканевого дефекта. Так же как и в серии Б, эффект значимой стимуляции регенераторных процессов в хронической ране обусловлен влиянием группы ростовых факторов, содержащихся в тромбоцитах, а также специфическим влиянием низкой концентрации лейкоцитов, содержащихся в лечебной комбинации.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что применение регенеративных технологий в лечении экспериментальной хронической раны (воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения длиной волны 1560 нм, инъекционного введения аллогенных МСК ЖТ и L-PRP позволяет в 1,84–2,5 раза сократить медианные сроки эпителизации раневого дефекта в сравнении с группой плацебо-контроля (Mann – Whitney U Test $Z=5,641231$, $p=0,0000001$) (рис. 14).

Механизмы такого ранозаживляющего действия в основных группах различны. Для серии А они во многом связаны с бактерицидным эффектом воздействия на рану высокоинтенсивного лазерного излучения определенных параметров, а также формированием на раневой поверхности пептидно-коагуляционной пленки,

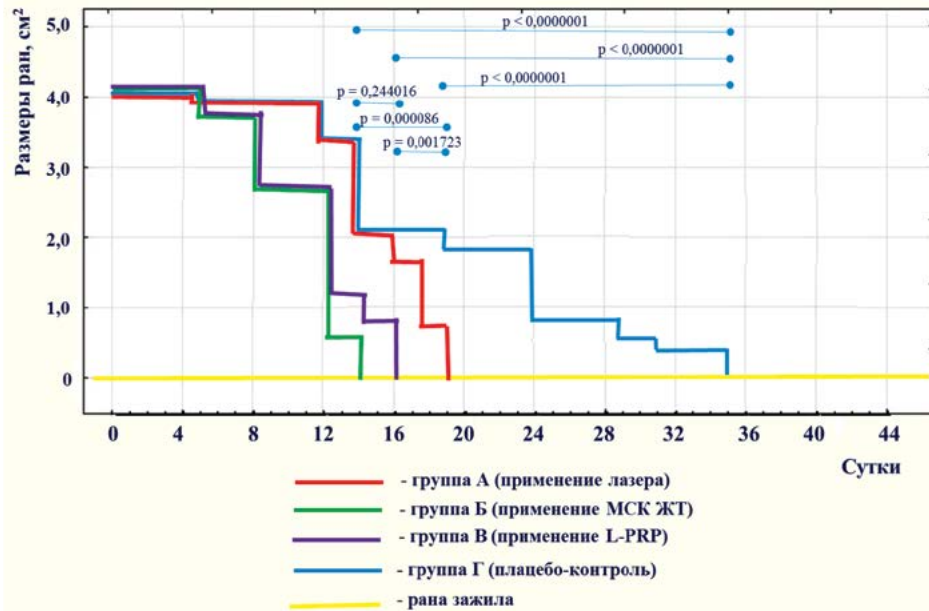


Рис. 14. Динамика сокращения раневой поверхности при использовании различных регенеративных лечебных технологий у экспериментальных животных
Fig. 14. Dynamics of wound surface reduction when using various regenerative therapeutic technologies in experimental animals

препятствующей в последующем экзогенному инфицированию тканей в этой зоне и способствующей регенерации раны в условиях незначительной (ограниченной) микробной контаминации. Также вероятными факторами ускоренной регенерации хронической раны после лазерного воздействия служат: инактивация пула протеолитических ферментов лазерным светом, а также «эффекты последствия» в результате обработки патологически измененных тканей лазерным светом (электромагнитные и ультразвуковые волны, клеточная осцилляция, изменение антиоксидантных и электростатических свойств тканей, и др.). Для серий Б и В ускоренное ранозаживление связано с мощным паракринным эффектом, обусловленным кратным и пролонгированным воздействием на краевую зону и ткани в области дна раны большой группы ростовых факторов, цитокинов, индукторов синтеза коллагенов, стимулирующих в первую очередь краевую эпителизацию за счет активации прогенераторных клеток пограничной зоны и усиливающих центростремительное перемещение эпителиоцитов (эпителиобластов). При этом более длительное функционирование в тканях раны имплантированных МСК ЖТ обеспечивает более мощный и продолжительный паракринный эффект, приводя к недостоверному уменьшению медианных сроков эпителизации раневого дефекта по сравнению с группой L-PRP (Mann – Whitney U Test $Z=1,165010$, $p=0,244016$) и достоверному сокращению (на 26,3%) – по сравнению с животными лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z=3,92804$, $p=0,000086$). В группе А формирование на раневой поверхности пептидно-коагуляционной пленки оказывает разнонаправленный эффект: с одной

стороны, она препятствует экзогенному инфицированию тканей в этой зоне и способствует регенерации раны в условиях незначительной микробной контаминации, с другой – несколько ограничивает сроки ее эпителизации.

■ ВЫВОДЫ

1. Все оцененные в эксперименте методы лечебного воздействия на хроническую рану (у животных группы А – с применением расфокусированного лазерного излучения длиной волны 1560 нм, группы Б – с инъекционным введением в дно и края раны суспензии аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани 500 тыс/мл и группы В – с инъекционным введением в дно и края раны аллогенной обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы) с полным основанием следует отнести к регенераторным технологиям, поскольку они существенно и достоверно ускоряют ее заживление, сокращая медианные сроки эпителизации раневого дефекта в сравнении с группой плацебо-контроля в 1,84–2,5 раза (Wilcoxon $Z=4,285714$, $p=0,000018$).
2. Воздействие на область моделированной хронической раны расфокусированного лазерного излучения длиной волны 1560 нм (0,1 с / 0,1 с, 5 Вт, диаметр светового пятна 0,7 см, дистанция 2 см, суммарная экспозиция 10 с) позволяет обеспечить достаточно быструю инволюцию дегенеративно-воспалительных изменений в очаге с ускоренным восстановлением функциональной активности замыкательного аппарата прямой кишки, нормализацией пищеварительной функции и уменьшением в 1,84 раза медианных сроков эпителизации раневого дефекта в сравнении с группой плацебо-контроля (Wilcoxon $Z=4,285714$, $p=0,000018$). При этом начиная с 9–10-х суток в мазках-отпечатках ран регистрируется превалирование регенераторного варианта цитогаммы с достоверным прогрессивным снижением регенеративно-дегенеративного индекса Ю.А. Давыдова (1999) в отношении исходного уровня к 8-м (Wilcoxon $Z=3,076052$, $p=0,002098$), 12-м (Wilcoxon $Z=3,505804$, $p=0,000455$), 14-м (Wilcoxon $Z=3,407771$, $p=0,000655$) и 19-м суткам (Wilcoxon $Z=2,201398$, $p=0,027709$).
3. Благоприятный вариант регенерации хронических ран промежности у лабораторных животных после лазерного воздействия обусловлен спецификой влияния данных параметров квантового излучения на воспаленные ткани в зоне патологического процесса и патогенную микрофлору. Определенную позитивную роль в восстановлении измененных тканевых структур играет снижение экссудативной реакции раны после воздействия лазера и формирование на ее поверхности тонкой коагуляционной фибрино-пептидной пленки с последующим развитием более плотного струпа со снижением интенсивности вторичного инфицирования с течением раневого процесса в более «комфортных» условиях пониженного уровня микробной контаминации. Вероятными факторами ускоренной регенерации хронической раны после лазерного воздействия служат: инактивация пула протеолитических ферментов лазерным светом, а также «эффекты последствия» в результате обработки патологически измененных тканей лазерным светом (электромагнитные и ультразвуковые волны, клеточная осцилляция, изменение антиоксидантных и электростатических свойств тканей и др.). При этом в группе А формирование на раневой поверхности пептидно-коагуляционной пленки оказывает разнонаправленный эффект: с одной стороны, она препятствует



экзогенному инфицированию тканей в этой зоне и способствует регенерации раны в условиях незначительной микробной контаминации, с другой – несколько ограничивает сроки ее эпителизации.

4. В лазерной серии А формирование на раневой поверхности пептидно-коагуляционной пленки оказывает разнонаправленный эффект: с одной стороны, пленка препятствует экзогенному инфицированию тканей в этой зоне и способствует регенерации раны в условиях незначительной (минимальной) микробной контаминации, с другой – несколько ограничивает сроки эпителизации тканевого дефекта.
5. Для серий Б (применение МСК ЖТ) и В (использование L-PRP) ускоренное ранозаживление связано с мощным паракринным эффектом, обусловленным кратным и пролонгированным воздействием на краевую зону и ткани в области дна раны большой группы ростовых факторов, цитокинов, индукторов синтеза коллагенов, стимулирующих в первую очередь краевую эпителизацию за счет активации прогенераторных клеток пограничной зоны и усиливающих центростремительное перемещение эпителиоцитов. При этом более длительное функционирование в тканях раны имплантированных МСК ЖТ обеспечивает более мощный и продолжительный паракринный эффект, приводя к недоверительному уменьшению медианных сроков эпителизации раневого дефекта по сравнению с группой L-PRP (Mann – Whitney U Test $Z=1,165010$, $p=0,244016$) и достоверному сокращению этого периода (на 26,3%) – по сравнению с животными лазерной серии (Mann – Whitney U Test $Z=3,92804$, $p=0,000086$).
6. Ввиду выявленного в экспериментальных исследованиях значимого регенераторного эффекта в отношении хронических ран промежности следует считать целесообразным местное использование в клинических условиях расфокусированного лазерного излучения длиной волны 1560 нм (0,1 с / 0,1 с, 5 Вт, диаметр светового пятна 0,7 см, дистанция 2 см, экспозиция от 3 до 5 секунд на 1 поле) с возможным сочетанным инъекционным введением в края и дно раны МСК ЖТ или обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Crovetti G., Martinelli G., Issi M., Barone M., Guizzardi M., Campanati B., Moroni M., Carabelli A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus. Apher. Sci.*, 2004;30(2):145–151. doi: 10.1016/j.transci.2004.01.004.
2. Gain Y.M., Tretiak S.I., Bogdan V.G. *Chronic wound: monograph. National Academy of Sciences of Belarus, Department of Medical Sciences. Minsk: Belarusian Science*, 2023; 367 p. (in Russian).
3. Richmond N.A., Maderal A.D., Vivas A.C. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol. Ther.*, 2013;26:187–196. doi:10.1111/dth.12051.
4. Frykberg R.G., Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2015;14(9):560–582. doi: 10.1089/wound.2015.0635.
5. Rice J.B., Desai U., Cummings A.K.G., Birnbaum H.G., Skornicki M., Parsons N. Burden of venous leg ulcers in the United States. *J. Med. Econ.*, 2014;17:347–356. doi: 10.3111/13696998.2014.903258.
6. Potekae N.N., Frigo N.V., Petersen E.V. Artificial leather: types, areas of application. *Clinical Dermatology and Venereology*, 2017;6:7–15. doi: <https://doi.org/10.17116/klinderma.20171667-15>. (In Russian).
7. Hamm R.L. *Wounds. Diagnosis and treatment. Atlas-reference book*. Translation from English: V.A. Mitisha, Yu.S. Paschalovoi. Moscow: GEOTAR-Media, 2021; 536 p. doi: 10.33029/9704-5950-8-WDT-2021-1-536. (in Russian).
8. Driscoll P. Wound prevalence and wound management, 2012–2020.2013. Accessed on 14 September 2015. Available online: <http://blog.medilience.com/2013/01/29/wound-prevalence-and-wound-management-2012-2020/>.
9. Enoch S., Price P. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds [Electronic resource]*. 2004. Mode of access: <http://www.worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html>. Date of access: 15.07.2022.
10. Harding K.G., Morris H.L., Patel G.K. Healing chronic wounds. *BMJ*, 2002;19(324):160–163.

11. Schultz G.S., Mast B.A. Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: cytokines, proteases and growth factors. *Wounds*, 1998;10 (sup F):1F–9F. https://www.awma.com.au/files/journal/0701_01.pdf.
12. Khramilin V.N. *Local treatment of wounds*. Moscow: Publishing house «Prosvet», 2012; 64 p. (in Russian).
13. Pleshkov V.G., Privolnev V.V., Golub A.V. Treatment of chronic wounds. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, 2015;14(2):58–65. (in Russian).
14. Potekaev N.N., Frigo N.V., Michenko A.V., Lvov A.N., Panteleev A.A., Kitaeva N.V. Chronic, long-term non-healing ulcers and wounds of the skin and subcutaneous tissue. *Clinical Dermatology and Venereology*, 2018;17(6):7–12. doi: 10.17116/klinderma2018170617. (in Russian).
15. Shanmugam V.K., Angra D., Rahimi H., McNish S. Vascultic and autoimmune wounds. *Venous Lymphat. Disord.*, 2017;5(2):280–292. doi: 10.1016/j.jvsv.2016.09.006.
16. Lam G., Ross F.L., Chiu E.S. Nonhealing ulcers in patients with tophaceous gout: a systematic review. *Adv. Skin Wound Care*, 2017;30(5):230–237. doi: 10.1097/01.ASW.0000515456.65405.56.
17. Denisov S.D., Morozkina T.S. Requirements for a scientific experiment using animals. *Health*, 2001;4:40–42. (in Russian).
18. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Purposes: 18.03.1986. Strasbourg: Council of Europe, 1986. 53 p.
19. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999;284(541):143–147. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
20. Lotfy A., Salama M., Zahran F., Jones E., Badawy A., Sobh M. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. *International journal of stem cells*, 2014;7:135–142. doi: 10.15283/ijsc.2014.7.2.135.
21. Niyaz M., Gурpinar O., Gunaydin S., Onur M. Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue derived mesenchymal stem cells: a simple technique. *Turk. J. Biol.*, 2012;36:658–664. doi: 10.3906/biy-1109-31.
22. Bogdan V.G., Zafarskaya M.M., Bagatka S.S., Yurkevich M.Yu., Gain Yu.M., Demidchik Yu.E. Characteristics of mesenchymal stem cells of human adipose tissue differentiated in the fibroblast direction. *Healthcare*, 2012;4:19–25. (in Russian).
23. Zhou D.H., Huang S.L., Wu Y.F., Wei J., Chen G.Y., Li Y., Bao R. The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, 2003;41(8):607–610.
24. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 2001;7(2):211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
25. Fenchin K.M. *Wound healing*. Kyiv, 1979; 167 p. (in Russian).
26. Pokrovskaya M.P., Makarov M.S. *Cytology of wound exudate as an indicator of the wound healing process*. Moscow: Medgiz, 1942; 48 p. (in Russian).
27. Davydov Yu.A., Larichev L.B. *Vacuum therapy of wounds and wound process*. Moscow: Medicine, 1999; 160 p. (in Russian).
28. Efimov E.V., Khoroshkevich A.V. Features of the wound process against the background of diabetes. Wounds and wound infections. *Journal named after Professor B.M. Little suit.*, 2015;2(3):30–35. doi: 10.17 650 / 2408-9613-2015-2-3-30-35. (in Russian).
29. Sapozhnikov A.G., Dorosevich A.E. *Histological and microscopic techniques: a manual*. Smolensk: SAU, 2000; 476 p. (in Russian).
30. Gain Yu.M., Kiseleva E.P., Bogdan V.G., Shakhrai S.V. Cellular technologies for restoring the integrity of the skin in case of extensive defects. *Medical Journal*. 2011;2:134–138. (in Russian).